

NANODIAMANTY – FLUORESCENČNÍ A ZOBRAZOVACÍ NANOSONDY

JITKA ŠLEGEROVÁ a PETR CÍGLER*

Laboratoř syntetické nanochemie, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
cigler@uochb.cas.cz

Došlo 17.10.13, přijato 6.1.14.

Klíčová slova: nanodiamant, fluorescence, biokompatibilita, povrchové modifikace, biologické zobrazování

Obsah

1. Úvod
2. Příprava a vlastnosti nanodiamantů
 - 2.1. Fluorescence nanodiamantů
 - 2.2. Biokompatibilita nanodiamantů a jejich chování v biologických systémech
3. Chemie povrchu nanodiamantu
4. Aplikace nanodiamantů
5. Závěr

1. Úvod

Cílem tohoto přehledného článku je představit vlastnosti a současné bioaplikace nového uhlíkového nanomateriálu – nanodiamantů. V krystalové mříži nanodiamantu lze vytvořit tzv. centra N-V, která vykazují vysoce stabilní fluorescence. Zaměříme se zde na využití nanodiamantů a center N-V v biologickém zobrazování, srovnáme je s jinými fluorescenčními sondami a popíšeme jejich chemické a koloidní vlastnosti. Představíme dosud známá fakta o toxicitě a biokompatibilitě nanodiamantů, jejich vstupu a lokalizaci v buňkách a možnosti cílení pomocí ligandů navázaných na jejich povrch.

Pro pochopení stavby a funkce biomolekul, buněčných částí, buněk i tkání je důležité umět tyto struktury pozorovat zblízka. Nejčastější cestou je jejich označení fluorescenčními značkami. Ideální fluorescenční značky jsou chemicky stabilní, rozpustné a netoxické látky vhodné velikosti, které nemění vlastnosti struktury, k níž jsou připojeny. Zároveň je potřeba umět tyto značky modifikovat tak, aby se dokázaly efektivně a selektivně vázat^{1,2}. Mezi nejčastěji používané fluorescenční značky patří fluorescen-

ční proteiny, organická barviva a nanokrystaly polovodičů (kvantové tečky). Výhodou zeleného fluorescenčního proteinu, který byl prvně izolován z medúzy *Aequorea victoria*, a jeho derivátů je možnost inkorporovat jeho gen do genomu nějakého organismu a koexprimovat jej s proteinem, který chceme zkoumat. Nevýhodou je jeho rozměrnost a také nestabilní fluorescence, která při delší expozici světlu podléhá fotodegradaci (angl. photobleaching)³. Nejčastěji využívanými fluorescenčními značkami jsou organická barviva, např. fluoresceiny, rhodaminy nebo cyaninová barviva. Tyto malé molekuly mohou být ve vysokém výtěžku připojeny k biomolekulám a obvykle nejméně interferují s jejich biologickými funkcemi. Jejich nevýhodou je opět nestabilní fluorescence, která pod stálým ozářením podléhá fotodegradaci¹.

Kvantové tečky jsou nanokrystaly anorganických polovodičů (tvořené typicky ze sloučenin telluru či selenu s kadmiiem). Jejich fluorescence je jasnější než u organických barviv a nepodléhá fotodegradaci. Kvantové tečky emitují fluorescenci, jejíž maximum je závislé na jejich velikosti. Jejich hlavní nevýhodou je přítomnost toxického prvku ve struktuře a blikající fluorescence^{1,4}.

Fotodegradace fluorescence je nevratné fotochemické zničení fluoroforu poskytující nefluorescenční molekulu, která znemožňuje dlouhodobé sledování značek pod mikroskopem^{1,4}. Organická barviva i fluorescenční proteiny podléhají fotodegradaci. Kvantové tečky jsou vůči fotodegradaci odolnější⁴, avšak v poslední době byla jejich fotodegradace také pozorována⁵. Blikání je proces, při kterém se při pozorování fluorescence objevují temné periody způsobené reverzibilním zapínáním a vypínáním fluorescence. Blikání je typické pro kvantové tečky, ale objevuje se i u organických barviv a fluorescenčních proteinů¹.

Alternativou k již zmíněným fluorescenčním značkám mohou být fluorescenční nanodiamanty^{6–9}. Nanodiamantové částice jsou krystaly diamantu o velikosti několika nanometrů až stovek nanometrů. Unikátními optickými vlastnostmi nanodiamantů jsou především fluorescence nepodléhající fotodegradaci, nevykazující blikání a dlouhá doba života fluorescence. Jejich výhodou je také biokompatibilita a nízká toxicita, která je, na rozdíl od kvantových teček, umožňuje používat i pro experimenty *in vivo*. Obdobně jako výše zmíněné fluorescenční značky mají i nanodiamanty své nevýhody. Jejich nevýhodou je nízká jasnost fluorescence, na jejímž zvýšení se intenzivně pracuje¹⁰. Cílem následujících odstavců je přiblížit vlastnosti nanodiamantů a jejich uplatnění jako fluorescenčních a vizualizačních sond.

* Autor článku byl v r. 2011 oceněn Českou společností chemickou Cenou Alfreda Badera II za bioorganickou a bioanorganickou chemii.

2. Příprava a vlastnosti nanodiamantů

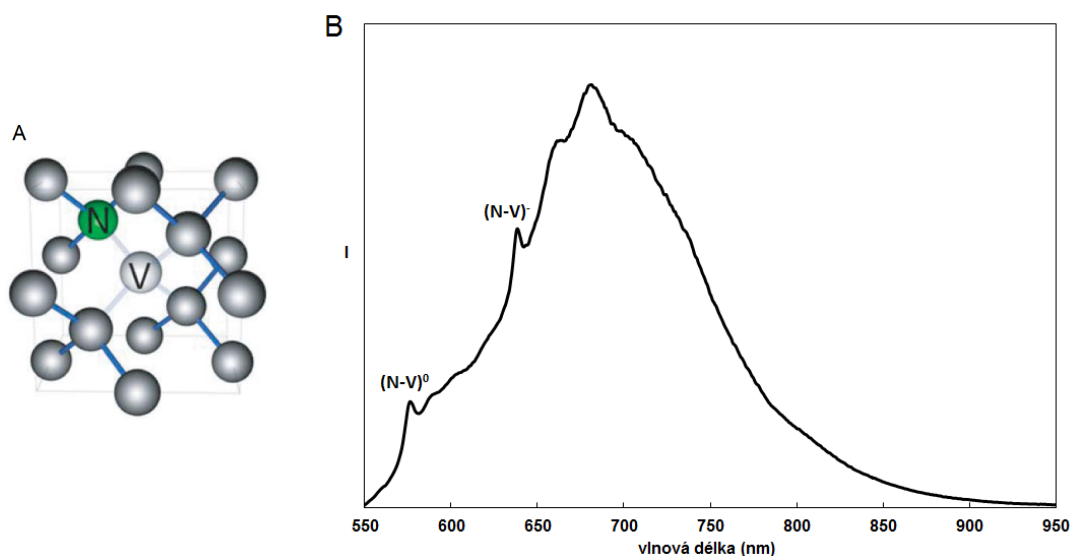
Nanodiamanty patří k rozsáhlé skupině často využívaných uhlíkových nanomateriálů, ke kterým lze zařadit např. grafen, uhlíkové nanotrubičky, uhlíková nanovlákna, fullereny a diamantové tenké vrstvy. Nanodiamanty mají krystalickou strukturu diamantu tvořenou sp^3 uhlíkovými atomy a díky tomu i jeho výjimečné vlastnosti. Vynikají tak vysokou tvrdostí, elektrochemickou inertností, odolností proti korozi, nízkým koeficientem tření a vysokou tepelnou vodivostí, využitelnou v materiálním inženýrství^{11–13}. Nanodiamanty je možno připravit různými způsoby. Mohou vznikat růstem za vysoké teploty a tlaku okolo zárodečného centra a následným drcením. Tak vznikají tzv. „high-pressure high-temperature“ (HPHT) nanodiamanty. Jsou komerčně dostupné¹² v ceně přibližně 50 \$/g. Další možností je detonace směsi výbušnin, především trinitrotoluenu a hexogenu. V přítomnosti neoxidujícího chladicího média zabraňujícího přeměně sp^3 uhlíku na grafit dochází ke vzniku tzv. detonačních nanodiamantů^{11,12}. Tento způsob přípravy byl objeven v tehdejší SSSR před 50 lety (cit.¹⁴). Obdobné nanočástice byly nalezeny i v mezihvězdném prachu a meteoritech¹³. Na způsobu přípravy nanodiamantů závisí i jejich vlastnosti a struktura. Detonační nanodiamanty jsou malé sférické a uniformní částice (s průměrem kolem 5 nm) s velkým povrchem a množstvím atomů sp^2 uhlíku na povrchu. HPHT nanodiamanty jsou větší částice se širší velikostní distribucí a menším množstvím sp^2 uhlíků na povrchu¹⁵. Jejich další povrchová modifikace je proto obtížnější.

2.1. Fluorescence nanodiamantů

Fluorescence nanodiamantů pochází z různých typů bodových poruch v krystalové mříži¹². Z pohledu zobrazo-

vání je nejvýznamnější tzv. centrum „dusík-vakance“ (N-V, z angl. nitrogen-vacancy, obr. 1A). Existence centra je umožněna přítomností malého množství substitučních atomů dusíku v krystalové mříži diamantu, které se do krystalu zabudovávají při procesu růstu. Centrum N-V pak vzniká následujícím postupem: nejprve je potřeba vytvořit vakance, tj. odstranit jednotlivé atomy uhlíku z krystalové mříže ozářením nanodiamantů vysokou energetickým svazkem urychlených částic (např. protonů, elektronů nebo alfa částic). Vzniklé vakance následně při žhání o teplotách > 600 °C migrují v krystalické mřížce diamantu. Pokud se vakance dostane do blízkosti atomu dusíku, vzniklý pár je stabilnější než samotná vakance a v diamantu vzniká centrum N-V. Množství center N-V (a tedy i fluorescenční jasnost částic) roste s velikostí nanodiamantových částic.

Po ozáření nanodiamantů zeleným světlem je možné detegovat fluorescenci center N-V v červené oblasti spektra (s emisním maximem okolo 700 nm a dvěma charakteristickými liniemi – tzv. zero phonon lines, ZPL, při 576 a 638 nm, obr. 1B). Tvar fluorescenčního spektra je nezávislý na velikosti částic a jeho intenzita je dána součtem příspěvků jednotlivých center N-V koexistujících v nanodiamantu. Vlnová délka emise je výrazně separovaná od autofluorescence buněk a je tedy výhodná pro sledování pomocí fluorescenční nebo konfokální mikroskopie. Důležitou vlastností center N-V je jejich extrémní fotostabilita (nedochází k fotodegradaci fluoroforů zvané photobleaching). Při uvážení dalších charakteristik, jako je časová stabilita průběhu fluorescence – absence „blikání“, pozorovaného např. u kvantových teček, a vysoký kvantový výtěžek, představují fluorescenční nanodiamanty zajímavou a mnohdy jiným způsobem nenahraditelnou alternativu k ostatním fluorescenčním značkám^{10,17–19}.



Obr. 1. (A) Schematické zobrazení¹⁶ center dusík-vakance (N-V). (B) Emisní spektrum nanodiamantu; maximum ~ 700 nm a dvě charakteristické linie (zero phonon lines, ZPL) při 576 nm ($N-V^0$) a 638 nm ($N-V$); I – bezrozměrná intenzita fluorescence

2.2. Biokompatibilita nanodiamantů a jejich chování v biologických systémech

Nanočástice jsou obecně považovány za potenciálně toxické zvláště kvůli své malé velikosti, se kterou je spojena možnost vnikat do buněk a lokalizovat se v kritických organelách^{12,20}. Nanočástice mohou z dýchacího ústrojí vniknout do nervů a v některých případech i procházet hematoencefalickou bariérou¹². Některé fluorescenční nanočástice (např. kvantové tečky) obsahují ionty toxických kovů. Důležitými vlastnostmi nanodiamantů z pohledu budoucího použití např. v biomedicínských aplikacích jsou právě jejich nízká toxicita a vysoká biokompatibilita^{21–23}. V rozmezí koncentrací vhodném pro bioaplikace nevyvolávají purifikované nanodiamanty zánětlivou nebo cytotoxickou odpověď, neprodukují významné množství reaktivních částic obsahujících kyslík (ROS) nebo cytokinů a nepůsobí v buňkách morfologické změny (cytoskeletonu nebo jádra) nebo změny životnosti buněk^{18,22,24–26}. V nedávné době bylo publikováno několik studií naznačujících toxicitu nanodiamantů při jejich vysokých koncentracích^{27,28}. Ta je závislá také na způsobu přípravy nanodiamantů. Menší detonační nanodiamanty více ovlivňují životnost buněk, jejich proliferaci a metabolické aktivity než větší HPHT nanodiamanty. To je způsobeno pravděpodobně rozdílem ve velikosti částic a přítomností neuspořádaných forem uhlíku na povrchu detonačních nanodiamantů^{24,26}. Toxicita obou typů nanodiamantů je však výrazně nižší než v případě ostatních uhlíkových nanomateriálů²³ (obr. 2).

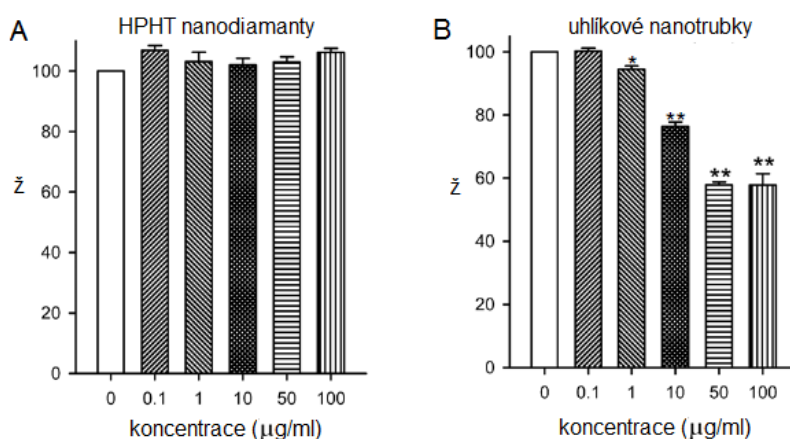
Nanodiamanty spontánně vstupují do buněk^{17,26}. Půčas internalizace je závislý na velikosti částice – čím menší částice, tím rychlejší je internalizace²⁹. Kvůli zjištění mechanismu internalizace nanodiamantů do buněk byly buňky inkubovány při nižší teplotě (4 °C) a v přítomnosti azidu sodného (látky, která inhibuje tvorbu ATP). Pokles internalizace nanodiamantů do buněk za těchto podmínek

znamená závislost internalizace na teplotě a energii a naznačuje aktivní transport endocytózou. Snížená internalizace v přítomnosti sacharosu v médiu, která způsobuje tvorbu klathrinových váčků, ukazuje, že nanodiamanty jsou internalizovány pomocí klathrinu. Při tomto způsobu se ligand obecně váže nejprve k buněčnému receptoru a poté je internalizován. Látka filipin jako inhibitor endocytózy zprostředkované kaveolinem nezpůsobila snížení vstupu nanodiamantů do buněk (obr. 3)^{29,30}. Endocytóza zprostředkovaná receptorem je usnadněna pravděpodobně díky proteinům adsorbovaným na povrch částice ze séra²⁹.

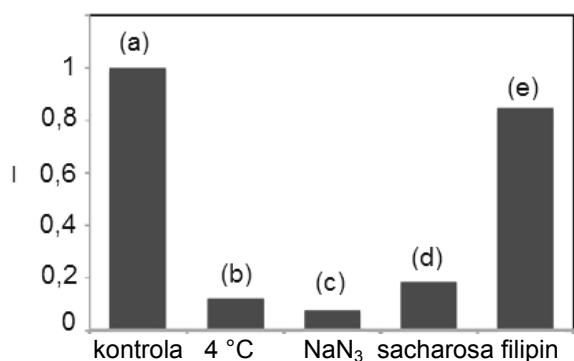
Endozomy jsou váčky využívané k transportu materiálu z extracelulárního prostoru. Tento materiál je pohlcen buňkou a uchycen v nově vytvořeném endozomu, který může později splýnout s lysozomem. Obsah váčků může být degradován nebo recyklován zpět na plazmatickou membránu. Z provedených studií vyplývá, že část internalizovaných nanodiamantů je lokalizována v endozomech²⁹. Přibližně 21 % HPHT nanodiamantů (s průměrem 25 nm) kolokalizovalo s endozomy v HeLa buňkách po 2 hodinách (cit.³¹). Nejmenší nanodiamantové částice (s průměrem 5 nm) byly nalezeny volně v cytoplasmě. Není prozatím jasné, zda byly částice přímo do cytoplazmy internalizovány pasivním transportem přes buněčnou membránu nebo byly vypuštěny z endozomů. Fakt, že některé nanodiamanty nejsou uvnitř endozomů, je nadějí pro bioaplikace nanodiamantů, jako je např. transport léčiv. Z pohledu potenciální genotoxicity je důležité, že žádné částice nebyly nikdy nalezeny v jádře buňky^{29,31}.

3. Chemie povrchu nanodiamantu

Detonační a HPHT nanodiamanty se liší reaktivitou, a to především díky různé velikosti primárních částic, jejich tvaru a chemickému složení (množství sp² uhlíků na povrchu). V pracích zabývajících se povrchovými modifi-



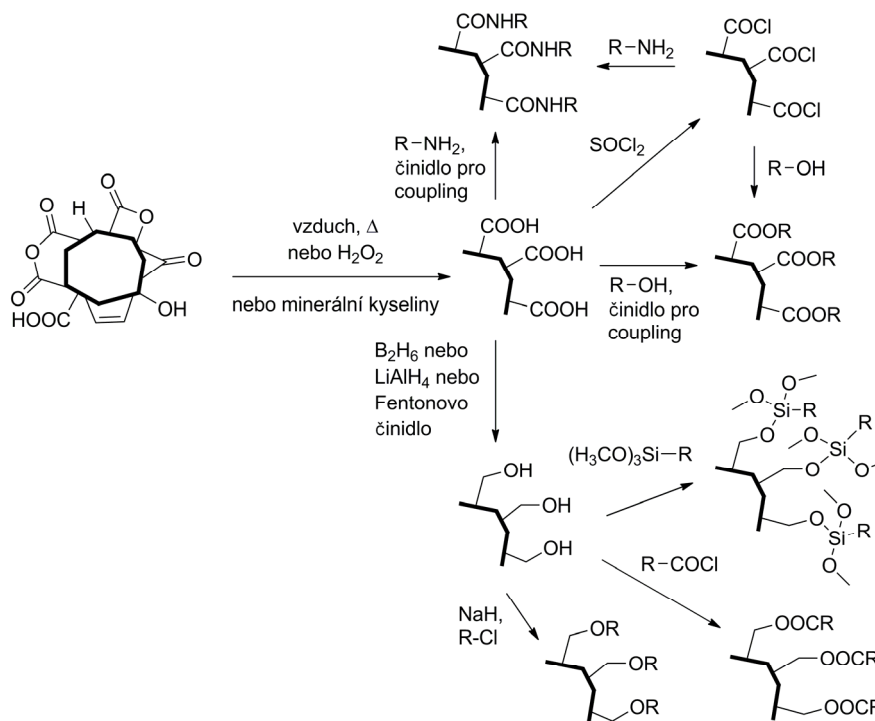
Obr. 2. Vliv dvou různých uhlíkových nanomateriálů na lidské plicní fibroblasty při koncentracích 0,1–100 µg ml⁻¹ měřené pomocí MTT esaje²⁴. (A) Nízká toxicita HPHT nanodiamantů. (B) Koncentračně závislá toxicita uhlíkových nanotrubeček; ž – životnost buněk v procentech



Obr. 3. Fluorescenční intenzita HPHT nanodiamantů v buňkách inkubovaných za různých podmínek: (a) kontrola při 37 °C, (b) při 4 °C, (c) s přidáním NaN₃, (d) sacharosy, (e) filipinu. Buňky byly inkubovány 2 hodiny s nanodiamanty o koncentraci 20 μg ml⁻¹ (cit.²⁹); I – bezrozměrná intenzita fluorescence

kacemi jsou nejčastěji používány detonační nanodiamanty. Studie přímo srovnávající reaktivitu různých připravených nanodiamantů však zatím nebyly provedeny.

Surové nanodiamanty nesou na svém povrchu vrstvy grafenu a kyslíkaté povrchové skupiny, nejčastěji karboxylové a hydroxylové skupiny, ketoskupiny, anhydridy a laktony (obr. 4). Po syntéze je třeba odstranit zbytky grafitového a jiného nediamantového uhlíku a nehořlavých



Obr. 4. Přehled nejčastěji používaných modifikací oxidovaných nanodiamantů. Reakce nikdy neprobíhají se 100% konverzí, proto na povrchu nanodiamantů nalezneme vždy směs různých funkčních skupin odpovídající reakční historii vzorku

kovových nečistot. Aby toto bylo možné, je třeba nejprve mechanicky (rozemletím pomocí mikrokuliček o vysoké hustotě, ultrazvukem) dezintegrovat nanodiamantové agregáty¹². Grafitický sp² uhlík lze odstranit oxidací na vzduchu při teplotách 400–430 °C, kdy je diamantový sp³ uhlík oxidován výrazně pomaleji. Zároveň je povrch obohacen o výše uvedené skupiny obsahující kyslík³². Vystavení nanodiamantů minerálním kyselinám pak pomůže povrch dále hydrofilizovat a odstranit eventuálně přítomné kovové nečistoty³³. Nejčastěji se používá směs koncentrovaných kyselin [H₂SO₄: HNO₃, 9:1 (v:v)] při 80 °C po dobu 3 dnů, následuje reakce s 0,1 M NaOH při 90 °C po dobu 2 h a 0,1 M HCl při 90 °C také po dobu 2 h (cit.³⁴). Po této proceduře je povrch obohacen o karboxylové skupiny a nanodiamanty tvoří ve vodě stabilní koloidy¹⁰. Tyto post-syntetické modifikace jsou důležité kromě snížení heterogenity povrchu také z hlediska toxicity materiálu, kterou nečistoty zvyšují.

Pro další konjugace, např. s proteiny, je výhodné mít jako výchozí materiál homogenní povrch, který by obsahoval ideálně jeden druh skupin. Existuje mnoho způsobů dosažení teoreticky homogenního povrchu (obr. 4), např. při zavedení hydroxylových skupin, aminoskupin nebo vytvoření hydrogenovaného povrchu. Pro redukci všech C=O skupin na hydroxyskupiny se používá nejčastěji hydrid lithno-hlinitý (LiAlH₄), pro přípravu hydrogenovaného povrchu se nanodiamanty upravují v mikrovlnném plazmovém reaktoru ve vodíkové atmosféře. Reakce s použitím UV záření s plynným amoniakem, případně

nejprve chlorem a poté s amoniakem, vede k zavedení aminoskupin na povrch³³. Skupiny na povrchu mohou reagovat s dalšími látkami tradičními chemickými postupy. Takto je možno zavést na povrch funkční skupiny jako např. alkynové nebo azidové³⁵. Výhodou těchto skupin je, že reagují selektivně pouze se svými reakčními partnery, a nikoliv s běžně dostupnými skupinami přítomnými v biomolekulách. Řadí se tak mezi tzv. bioortogonální skupiny.

Biomolekuly se mohou připojovat na povrch dvěma různými způsoby – nekovalentními interakcemi (adhezi nebo pomocí elektrostatických a jiných polárních vazeb či hydrofobních interakcí), nebo kovalentně, reakcí se skupinami přítomnými na povrchu částice. Nekovalentní připojení biomolekul lze relativně snadno experimentálně provést smícháním daných komponent. Byla popsána nekovalentní modifikace povrchu nanodiamantu, např. cytochromem c (cit.³⁶), lysozomem³⁷, hovězím sérovým albuminem³⁸, neurotoxinem α -bungarotoxinem³⁹ nebo antigenem (adhezivním proteinem mušlí)⁴⁰. Kovalentní připojení umožňuje větší míru specifity a síly vazby, realizace připojení je ovšem složitější³⁶. Ke kovalentnímu připojení je nejčastěji využívána amidová vazba, jako při připojení proteinů transferinu⁴¹ a trypsinu⁴². Kovalentní připojení biomolekul mohou být ovšem problematická z důvodu nízké přístupnosti a reaktivity skupin na povrchu nanočástic. Obalením částic tenkou vrstvou biokompatibilního, ale reaktivního materiálu, je možno tomuto problému předejít. Vhodnou možností je pokrytí nanodiamantů vrstvou dobře definovaného silikagelu (hydratovaného oxidu křemičitého), který umožňuje další modifikace s biomolekulami s vysokým výtěžkem. Nanodiamanty pokryté silikagelem mají vyšší tvarovou i velikostní monodisperzitu a jsou sférickější než výchozí materiál. Výhodou pokrytí nanodiamantů vrstvou silikagelu je i zlepšení koloidní stability nanodiamantů v prostředí s iontovou silou, např. v biologickém prostředí^{43,44}. Nemodifikované nanodiamanty nejsou v tomto prostředí stálé a agregují. Další možností je obalení nanodiamantu různými polymery – např. polyglycerolem⁴⁵ nebo polyethylenglykolem⁴⁶, které opět zlepšují koloidní chování nanodiamantů a umožňují vysoké výtěžky dalších modifikací biomolekulami. Bylo ukázáno, že vrstva polymeru na nanočásticích vytváří neimunogenní povrch a funguje tedy jako ochrana před opsonizací, což zajistí delší cirkulaci nanočástic v krevním oběhu^{46–48}.

Pro další aplikace modifikovaných nanodiamantů je podstatné, aby si připojené biomolekuly na povrchu zachovaly svoji aktivitu¹⁸. K tomu mohou být využity různé spojovací molekuly mezi povrchem nanodiamantu a biomolekulou využívané pro potlačení nespecifických interakcí proteinů s povrchem nanodiamantu⁴⁹ nebo potlačení změny konformace proteinů způsobené silnými interakcemi mezi proteinem a povrchem nanodiamantu³⁷. Snížení sterických zábran je podstatné například u enzymů, jejichž aktivní místa mohou být bráněna blízkostí povrchu⁵⁰.

4. Aplikace nanodiamantů

Mezi vlastnosti, které umožňují využití nanodiamantů od bioaplikací po uplatnění v kvantových počítačích, patří především jejich chemická stabilita, biokompatibilita, nízká toxicita, výjimečné optické vlastnosti a široké možnosti modifikace jejich povrchu. V biomedicině byly nanodiamanty dosud použity především pro fluorescenční značení, cílení buněk, transport léčiv a jejich řízené uvolnění a pro imobilizace enzymů^{18,26,37,51}.

Pro fluorescenční značení a zobrazování se využívají nanodiamanty připravené metodou HPHT, v nichž lze vygenerovat největší počet fluorescenčních center N-V. Neblíkáající fluorescence nepodléhající fotodegradaci (viz část 2.1) je výjimečnou optickou vlastností, která umožňuje zobrazování a sledování osudu nanodiamantu s vysokým časovým rozlišením i po velmi dlouhou dobu. Ačkoliv většina pozorování byla provedena na buňkách¹⁹, v nedávných pracích byly jako modelové organismy použity i malá zvířata (červ *Caenorhabditis elegans*⁵² a myš⁵³). Označení buněk nanodiamanty je také možno vysledovat pomocí Ramanova rozptylu. Nanodiamanty jsou v tomto případě ideální náhradou toxických kovů (např. stříbra) pokrytých aktivními barvivy, které se běžně pro tyto účely používají. Nanodiamanty vykazují v Ramanově spektru snadno vystopovatelný, typicky velmi intenzivní a úzký pás při 1332 cm⁻¹, který odpovídá krystalickým sp³ uhlíkům ve struktuře²⁶.

Cílení struktur je zprostředkováno cílicí molekulou, která může být připojena na povrch nanodiamantu. Cílicí molekula zajistí afinitu k cílenému místu (například k buňce nebo jiné molekule). Cílicí molekula může být na povrchu nanodiamantu navázána ve vysoké lokální koncentraci. Při zapojení více molekul do vazby s cíleným povrchem pak může být síla interakce násobně zvýšena oproti jednotlivému ligandu (fenomén zvaný avidita). Připojením nanodiamantu (fluorescenční značky) k cílicí molekule je možné sledovat cestu cílicí molekuly k cílenému místu a zobrazit tak např. rakovinnou buňku.

Nanočástice schopné cílení mohou být dále využity pro cílený přenos léčiv, kdy je léčivo transportováno přímo k postiženému místu, kde je kontrolovaně uvolněno, aby mohlo působit⁵⁴. Cílená terapie je specifická a účinná vzhledem k tomu, že jsou potlačeny vedlejší účinky léčiva ve zdravých tkáních⁵⁵. Vhodné nosiče léčiv mohou transportovat velká množství léčiv a prodloužit dobu cirkulace v krvi, pokud nevyvolávají imunitní reakci. Léčiva mohou být asociována s lipozomy, micelami, dendrimery, virům podobnými částicemi nebo polymery. Byla použita různá léčiva jako doxorubicin, cisplatina, toxické proteiny (ricin nebo diphtheria toxin) nebo nukleové kyseliny^{54–56}. Malé detonační nanodiamanty nesoucí léčivo doxorubicin jsou považovány za vhodný nosič pro léčbu rakovinného onemocnění. Uvolnění léčiva je pomalé a dlouhodobé v porovnání s volným léčivem v případě *in vitro* i *in vivo*^{21,51,57}.

Enzymy, které jsou výhodnými specifickými biokatalyzátory za mírných podmínek, mají mnoho nevýhod jako nedostatečnou dlouhotrvající stabilitu za reagujících podmínek a náročnou obnovitelnost a znovupoužitelnost enzymu. Tyto problémy mohou být odstraněny imobilizací enzymů na nějakém povrchu (např. nanodiamantu), který zvyšuje jejich stabilitu, umožňuje opakované použití a snadné oddělení enzymů ze směsi a může též zlepšit jejich vlastnosti^{37,42,58}. Kromě enzymů se může na povrch nanodiamantu nekovalentně navázat také antigen. Nanodiamant v tomto případě vystupuje jako velmi výhodné adjuvans udržující antigen (konkrétně adhezivní protein mušlí) ve stabilní konformaci, která zaručí silnou imunitní odpověď⁴⁰.

Nedávno bylo ukázáno, že fluorescence nanodiamantu může být ovlivněna chemismem jeho povrchu^{59,60}. Centrum N-V se v materiálu vyskytuje ve dvou energetických stavech – neutrální (N-V)⁰ a záporně nabitě (N-V)⁻. Tato centra se liší emisními spektry [(N-V)⁰ má maximum při 575 nm, (N-V)⁻ při 638 nm], a tedy barvou fluorescence (obr. 1B). Vlivem chemických změn na povrchu nanodiamantu lze u dostatečně malé částice přepínat poměrné zastoupení center, což je detegovatelné změnou fluorescenčního spektra. Například pro nanodiamant s hydrogenovaným povrchem je fluorescence (N-V)⁻ zhasnuta, avšak fluorescence (N-V)⁰ je nadále detegovatelná. Po oxidaci hydrogenovaných nanodiamantů dochází k opětovnému obnovení fluorescence (N-V)⁻. Tato schopnost otevírá aplikace nanodiamantů jako senzorů⁵⁹⁻⁶² – látek schopných monitorovat chemické procesy, změny v buňce nebo detegovat přítomnost specifických molekul v okolí nanodiamantu (např. uvolňování léčiva z povrchu).

5. Závěr

Nanodiamant je materiál s unikátními vlastnostmi, který lze chemicky modifikovat. K jeho nejvýznamnějším vlastnostem patří jeho extrémně fotostabilní fluorescence (umožňující dlouhodobé pozorování nanodiamantů) a biokompatibilita, která dovoluje jejich použití v živých systémech. Modifikace povrchu umožňují úpravu nanodiamantu pro konkrétní aplikace, ať se jedná o zobrazování pomocí HPHT nanodiamantů v buňkách nebo *in vivo*, či přenos léčiv a jejich kontrolované uvolnění pomocí detonačních nanodiamantů. Ačkoli bylo vypracováno mnoho postupů k jejich modifikaci, žádný z nich se prozatím neustálil natolik, aby byly modifikované nanodiamanty používány širěji. Vývoj je potřeba orientovat na koloidně stálé systémy s dobře definovaným chemismem vhodným pro jednotlivé aplikace.

Práce vznikla za finanční podpory grantů GA ČR č. P108/12/0640 a MŠMT ČR č. LH11027.

LITERATURA

1. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T.: *Nat. Methods* 5, 763 (2008).
2. Sahoo H.: *RSC Adv.* 2, 7017 (2012).
3. Zhang J., Campbell R. E., Ting A. Y., Tsien R. Y.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 906 (2002).
4. Parak W. J., Pellegrino, T., Plank, C.: *Nanotechnology* 16, R9 (2005).
5. Shi X., Tu Y., Liu X., Yeung E. S., Gai H.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 3130 (2013).
6. Badea I., Kaur R.: *Int. J. Nanomed.* 2013, 203.
7. Barnard A. S.: *The Analyst* 134, 1751 (2009).
8. Hui Y. Y., Cheng C. L., Chang H. C.: *J. Phys. Appl. Phys.* 43, 374021 (2010).
9. Xing Y., Dai L.: *Nanomedicine* 4, 207 (2009).
10. Havlik J., Petrakova V., Rehor I., Petrak V., Gulka M., Stursa J., Kucka J., Ralis J., Rendler T., Lee S.Y., Reuter R., Wrachtrup J., Ledvina M., Nesladek M., Cigler P.: *Nanoscale* 5, 3208 (2013).
11. Mochalin V. N., Shenderova O., Ho D., Gogotsi Y.: *Nat. Nanotechnol.* 7, 11 (2012).
12. Schrand A. M., Hens S. A. C., Shenderova O. A.: *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 34, 18 (2009).
13. Holt K. B.: *Philos. Trans. R. Soc., A* 365, 2845 (2007).
14. Danilenko V. V.: *Phys. Solid State* 46, 595 (2004).
15. Krueger A.: *J. Mater. Chem.* 21, 12571 (2011).
16. Balasubramanian G., Chan I. Y., Kolesov R., Al-Hmoud M., Tisler J., Shin C., Kim C., Wojcik A., Hemmer P. R., Krueger A., Hanke T., Leitenstorfer A., Bratschitsch R., Jelezko F., Wrachtrup J.: *Nature* 455, 648 (2008).
17. Fu C. C., Lee H. Y., Chen K., Lim T. S., Wu H. Y., Lin P. K., Wei P. K., Tsao P. H., Chang H. C., Fann W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 727 (2007).
18. Vajjayanthimala V., Chang H. C.: *Nanomedicine* 4, 47 (2009).
19. Chang Y. R., Lee H. Y., Chen K., Chang C. C., Tsai D. S., Fu C. C., Lim T. S., Tzeng Y. K., Fang C. Y., Han C. C.: *Nat. Nanotechnol.* 3, 284 (2008).
20. Li X., Wang L., Fan Y., Feng Q., Cui F.: *J. Nanomater.* 2012, 1.
21. Huang H., Pierstorff E., Osawa E., Ho D.: *Nano Lett.* 7, 3305 (2007).
22. Schrand A. M., Huang H., Carlson C., Schlager J. J., Osawa E., Hussain S. M., Dai L.: *J. Phys. Chem. B* 111, 2 (2007).
23. Schrand A. M., Dai L., Schlager J. J., Hussain S. M., Osawa E.: *Diamond Relat. Mater.* 16, 2118 (2007).
24. Liu K. K., Cheng C. L., Chang C. C., Chao J. I.: *Nanotechnology* 18, 325102 (2007).
25. Zhu Y., Li J., Li W., Zhang Y., Yang X., Chen N., Sun Y., Zhao Y., Fan C., Huang Q.: *Theranostics* 2, 302 (2012).
26. Chao J. I., Perevedentseva E., Chung P. H., Liu K. K., Cheng C. Y., Chang C. C., Cheng C. L.: *Biophys. J.* 93, 2199 (2007).

27. Xing Y., Xiong W., Zhu L., Osawa E., Hussin S., Dai L.: *ACS Nano* 5, 2376 (2011).
28. Zhang X., Yin J., Kang C., Li J., Zhu Y., Li W., Huang Q., Zhu Z.: *Toxicol. Lett.* 198, 237 (2010).
29. Faklaris O., Joshi V., Irinopoulou T., Tauc P., Sennour M., Girard H., Gesset C., Arnault J. C., Thorel A., Boudou J. P.: *ACS Nano* 3, 3955 (2009).
30. Vaijyanthimala V., Tzeng Y. K., Chang H. C., Li C. L.: *Nanotechnology* 20, 425103 (2009).
31. Faklaris O., Garrot D., Joshi V., Druon F., Boudou J. P., Sauvage T., Georges P., Curmi P. A., Treussart F.: *Small* 4, 2236 (2008).
32. Osswald S., Yushin G., Mochalin V., Kucheyev S. O., Gogotsi Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 11635 (2006).
33. Krueger A., Lang D.: *Adv. Funct. Mater.* 22, 890 (2012).
34. Ushizawa K., Sato Y., Mitsumori T., Machinami T., Ueda T., Ando T.: *Chem. Phys. Lett.* 351, 105 (2002).
35. Meinhardt T., Lang D., Dill H., Krueger A.: *Adv. Funct. Mater.* 21, 494 (2011).
36. Huang L. C. L., Chang H. C.: *Langmuir* 20, 5879 (2004).
37. Nguyen T., Chang H. C., Wu V. W. K.: *Diamond Relat. Mater.* 16, 872 (2007).
38. Tzeng Y. K., Faklaris O., Chang B. M., Kuo Y., Hsu J. H., Chang H. C.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 50, 2262 (2011).
39. Liu K. K., Chen M. F., Chen P. Y., Lee T. J. F., Cheng C. L., Chang C. C., Ho Y. P., Chao J. I.: *Nanotechnology* 19, 205102 (2008).
40. Kossovsky N., Gelman, A., Hnatyszyn H. J., Rajguru S., Garrell R. L., Torbati S., Freitas S. S., Chow G. M.: *Bioconjugate Chem.* 6, 507 (1995).
41. Weng M. F., Chiang S. Y., Wang N. S., Niu H.: *Diamond Relat. Mater.* 18, 587 (2009).
42. Wei L., Zhang W., Lu H., Yang P.: *Talanta* 80, 1298 (2010).
43. Bumb A., Sarkar S. K., Billington N., Brechbiel M. W., Neuman K. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 135, 7815 (2013).
44. Von Haartman E., Jiang H., Khomich A. A., Zhang J., Burikov S. A., Dolenko T. A., Ruokolainen J., Gu H., Shenderova O. A., Vlasov I. I., Rosenholm J. M.: *J. Mater. Chem. B* 1, 2358 (2013).
45. Zhao L., Takimoto T., Ito M., Kitagawa N., Kimura T., Komatsu N.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 50, 1388 (2011).
46. Zhang X., Fu C., Feng L., Ji Y., Tao L., Huang Q., Li S., Wei Y.: *Polymer* 53, 3178 (2012).
47. Zhang L., Gu F. X., Chan J. M., Wang A. Z., Langer R. S., Farokhzad O. C.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761 (2008).
48. Prokop A., Davidson J. M.: *J. Pharm. Sci.* 97, 3518 (2008).
49. Yeap W. S., Tan Y. Y., Loh K. P.: *Anal. Chem.* 80, 4659 (2008).
50. Cao L.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 217 (2005).
51. Man H. B., Ho D.: *Phys. Status Solidi A* 209, 1609 (2012).
52. Kuo Y., Hsu T. Y., Wu Y. C., Hsu J. H., Chang H. C., Hasan Z. U., Hemmer P. R., Lee H., Santori C. M.: *Proc. SPIE* 8635, 863503 (2013).
53. Vaijyanthimala V., Cheng P. Y., Yeh S. H., Liu K. K., Hsiao C. H., Chao J. I., Chang H. C.: *Biomaterials* 33, 7794 (2012).
54. Li H., Sun H., Qian Z. M.: *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 206 (2002).
55. Daniels T. R., Bernabeu E., Rodríguez J. A., Patel S., Kozman M., Chiappetta D. A., Holler E., Ljubimova J. Y., Helguera G., Penichet M. L.: *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1820, 291 (2012).
56. Daniels T. R., Delgado T., Helguera G., Penichet M. L.: *Clin. Immunol.* 121, 159 (2006).
57. Chow E. K., Zhang X. Q., Chen M., Lam R., Robinson E., Huang H., Schaffer D., Osawa E., Goga A., Ho D.: *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra21 (2011).
58. Bornscheuer U. T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 42, 3336 (2003).
59. Petrakova V., Nesladek M., Taylor A., Fendrych F., Cigler P., Ledvina M., Vacik J., Stursa J., Kucka J.: *Phys. Status Solidi* 208, 2051 (2011).
60. Petrakova V., Taylor A., Kratochvilova I., Fendrych F., Vacik J., Kucka J., Stursa J., Cigler P., Ledvina M., Fiserova, A.: *Adv. Funct. Mater.* 22, 812 (2012).
61. Rehor I., Mackova H., Filippov S. K., Kucka J., Proks V., Slegerova J., Turner S., Tendeloo G. Van, Ledvina M., Hruby M., Cigler P.: *ChemPlusChem* DOI: 10.1002/cplu.201300339 (2013).
62. Rehor I., Slegerova J., Kucka J., Proks V., Petrakova V., Adam M.-P., Treussart F., Turner S., Bals S., Sacha P., Ledvina M., Wen A. M., Steinmetz N. F., Cigler P., *Small* DOI: 10.1002/smll.201302336 (2013).

J. Šlegerová and P. Cigler (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Nanodiamonds – Fluorescent and Imaging Nanoprobes**

Fluorescent nanodiamonds (NDs) attracted attention as a new promising type of nanoparticles for bioapplications. This carbon nanomaterial with low-toxicity is able to accommodate fluorescent nitrogen-vacancy (N-V) color centers, prime examples of non-photobleachable defects of diamond crystal lattice. An overview of ND applications in bioimaging is presented. NDs are compared with other fluorescent probes and their specific chemical and colloidal properties were shown. The biologically relevant properties of fluorescent NDs such as toxicity, biocompatibility and their cellular localization and internalization are discussed.